

⑫ 特許公報 (B 2)

昭60-4938

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 昭和60年(1985)2月7日

G 01 N 33/536
A 61 K 39/007906-2G
7043-4C

発明の数 2 (全16頁)

⑮ 発明の名称 免疫学的試薬及びその使用方法

前置審査に係属中

⑯ 特 願 昭51-7067

⑰ 公 開 昭51-101121

⑱ 出 願 昭51(1976)1月23日

⑲ 昭51(1976)9月7日

優先権主張

⑳ 1975年1月29日㉑ 米国(U S)㉒ 545066

㉓ 1975年3月6日㉔ 米国(U S)㉕ 555908

㉖ 1975年9月19日㉗ 米国(U S)㉘ 615024

⑲ 発 明 者	カールトン・デイトン	アメリカ合衆国カリフォルニア州92640ガーデン グローブ ラドナ ストリート10561
⑲ 発 明 者	ユージン・アシユター	アメリカ合衆国メリーランド州ガイザース バーク フェンスライン コート22
⑲ 発 明 者	ジェローム・クレメソン	アメリカ合衆国メリーランド州タコマ パーク メープル アベニュー 7710
⑲ 発 明 者	ロドルフォ・ロドリゲス	アメリカ合衆国メリーランド州 コロンビア グレートヘッド コート 5482
⑲ 発 明 者	ボール・プライアローン	アメリカ合衆国メリーランド州 ダブリュ ハイアツツビル ガム・ウッド・ドライブ・3106
⑲ 出 願 人	クーパー・ラボラトリーズ、インコーポレイテッド	アメリカ合衆国カリフォルニア州パロアルト、ポータードライブ3145
⑲ 代 理 人	弁理士 杉村 暁秀	外1名
審 査 官	秋月 美紀子	

1

2

⑳ 特許請求の範囲

1 少なくともポリエチレングリコール溶液より成る免疫学的試薬において、該試薬が前記ポリエチレングリコールとこれ以外の非イオン表面活性剤との混合物の水溶液より成り、前記水溶液が使用中、約3〜6重量%の該混合物を含有し且つかかる範囲内で約0.7〜1.7の範囲の計算HLB値(親水性-親油性バランス値)を有して成ることを特徴とする免疫学的試薬。

2 前記混合物濃度が最初前記3〜6%の濃度の範囲でなくとも、前記濃度を前記範囲内に調整するため、該水溶液に抗血清を含有させて成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の免疫学的試薬。

3 前記非イオン表面活性剤が(a)酸化エチレンと

ポリオキシプロピレンのブロック共重合体、(b)直鎖第一級脂肪族オキシアルキル化アルコール、(c)グリセリンモノステアレート、(d)アルキルアールスルホネート又は(e)米国特許第2979528号記載のポリオールより成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の免疫学的試薬。

4 ポリエチレングリコールが約4000〜6000の分子量を有し、且つ非イオン表面活性剤が酸化エチレンとポリオキシプロピレンのブロック共重合体より成り、溶液のHLB値が約0.7〜1.3より成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の免疫学的試薬。

5 水溶液が約20〜40重量%のポリエチレングリコールと約80〜60重量%の酸化エチレンとポリオキシプロピレン重合体のブロック共重合体を含有

して成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の免疫学的試薬。

6 前記混合物の濃度が約4重量%であり且つ前記混合物が約25重量%のポリエチレングリコールと約75重量%の前記ブロック共重合体を含有して成ることを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の免疫学的試薬。

7 抗体-抗原錯体を生成させるための抗体と抗原との反応を含む免疫学的アッセイ法において、前記反応により生成された抗原-抗体錯体の不溶化を実質的に増加させるため、ポリエチレングリコールとこれ以外の非イオン表面活性剤との混合物の水溶液より成り、前記水溶液が使用中約3~6重量%の該混合物を含有し且つかかる範囲内で約0.7~1.7の範囲の計算HLB値(親水性-親油性バランス値)を有する少なくともポリエチレングリコール溶液より成る免疫学的試薬を使用することを特徴とする免疫学的アッセイ法。

8 前記試薬を比濁、酵素、電気泳動又は放射線免疫アッセイを遂行するために利用することを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の免疫学的アッセイ法。

9 前記抗原、抗体及び試薬を、前記抗体-抗原錯体の微小濃度の関数である光散乱測定を行うことにより比濁分析を行なう前に前記抗体-抗原錯体を生成するために温置することを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の免疫学的アッセイ法。

10 前記試薬、及び免疫グロブリンの形態の前記抗体及び抗原を、不溶化免疫グロブリンの微小濃度の関数である光散乱測定を行なうことにより比濁分析を実施する以前に不溶化免疫グロブリンの抗体-抗原錯体を生ぜしめるため温置することを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の免疫学的アッセイ法。

発明の詳細な説明

本発明は一般には免疫沈殿反応の範囲を増強することができる免疫学的試薬に関する。更に詳細には、本発明は種々の免疫学的アッセイ法に利用することができる免疫学的試薬溶液に関する。

本発明は又免疫学的アッセイ法、特に抗体-抗原錯体を生成する抗体と抗原との反応を含むこれら免疫学的アッセイ法に関し、その不溶化は本発明試薬のアッセイ法の利用により実質的に増加される。

アッセイにおいて1段階又はその他の段階で、且つ異なる目的で、できるだけ多くの抗原-抗体錯体の不溶化を必要とする広汎な方法学の多数の免疫学的アッセイ法がある。例えば、錯体の不溶化は電気泳動分析、酵素アッセイ、放射線免疫アッセイ(RIA)及び比濁アッセイの如き例証の重要な従来の免疫学的アッセイ技術において重要な役割を演じ、且つ多くの研究がこれらのアッセイを改善するため錯体の不溶化を増大させる開発方法に向けられた。普通、錯体の不溶化は、単離された反応生成物か未反応の反応体を意味深長な診断学的アッセイを提供するため別々に分析できるよう特定アッセイに含まれる未反応の免疫学的反応体から免疫学的反応生成物を単離するために必要である。

例えば、比濁分析を含む免疫学的方法に対して、試料の温置及び比濁計器の読みを取る前に試料をポリエチレングリコール重合体溶液で希釈することが既に知られている。ポリエチレングリコールは懸濁粒子の濃度を増加させることにより比濁分析を改善し、このようにして分析を改善するが、試料中の懸濁粒子の不満足な濃度による不適当な試験範囲又は感度の故に多くの生物学的成分の満足な分析を行なうことができないという問題が残る。

本発明の広い目的は、ポリエチレングリコール単独から得られるものを越えて抗体-抗原錯体の不溶化を著しく増加せしめ、次いで比濁定量法か他の定量法が使用されるにせよ、ポリエチレングリコール単独では可能でない生学的成分の分析を許すため試料中の懸濁粒子の濃度を増加せしめるのに有効な改善された免疫学的試薬を提供することにより前述の問題を解決するにある。

更に詳細には、本発明は、少なくともポリエチレングリコール溶液より成る免疫学的試薬において、該試薬がポリエチレングリコールとこれ以外の非イオン表面活性剤の混合物の水溶液より成り、前記水溶液が使用中、約3~6重量%の該混合物を含有し且つかかる範囲内で約0.7~1.7の範囲の計算HLB値(親水性-親油性バランス値)を有して成ることを特徴とする。重要なことは、例えば免疫学的アッセイ法で「使用中」でない場合、水溶液は3%以下及び6%以上の混合物濃度を有することができるが、それにも係らず使用前

又は「使用中」に約3~6%の範囲内の濃度を有するように調整された混合物の濃度を与えることは本発明の目的に有用である。それ故に、追加の特許請求の範囲で使用する「使用中」の用語により、濃度範囲が3~6%の規定範囲外の場合、アツセイ手順間又はそれ以前にこれらの限界に調整される限り、その混合物濃度は最初に必ずしも約3~6%の範囲内にあることを要しない試薬をも包含することは本発明者等の主張である。

本発明者等は又抗体-抗原錯体を生成させるための抗体と抗原との間の反応を含む免疫学的アツセイ法を提供するものであり、該方法は前記反応により生成される抗原-抗体錯体の不溶化の範囲を実質的に増加させる本発明試薬をその中で利用することを特徴とする。

都合良くは、試薬を比濁、酵素、電気泳動又は放射線免疫アツセイを遂行するための試験媒質内に導入する。

例えば、比濁アツセイ法が抗体-抗原錯体の形態での生物学的成分を分析するために導入される場合、試薬及び生物学的成分の懸濁粒子は最初温置されその後比濁分析が遂行される。この方法によれば、光源は液体試料を通過するように成されかくして光線は懸濁粒子を通じて導かれる。これら光線は粒子を打つ場合、それら粒子は光源から例えば直角の如き所定角度で散乱又は拡散され次いで光電池により受け止められる。この散乱光は粒子濃度の量に直接に比例し、順次そのようにして計器面上で正確に測定される電気信号に転換される。

比濁分析に適当な計器の例はハイランド・レーザー・ネフエロメーターPDQ™ (Hyland Laser Nephelometer PDQ™, Hyland Laboratories) ; アミンコーフルオロコロリメーター (Aminco-Fluorocolorimeter, American Instrument Company) ; アミンコーボウマン・スペクトロフトフルオロメーター (SPF) (Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer (SPF)) 及び付属のフルオロネフエロメーターを有するオート・アナライザーII (Auto Analyzer II, Technicor Instruments Corporation) である。

これらの比濁原理及び装置により、臨床技術士は、例えば免疫グロブリンIgG、IgA、IgM、ト

ランスフェリン、補体C₃、ハプトグロビン、 α_1 -抗トリプシン、 β -リポたん白質、アルブミン、 α_2 -マクログロブリン、 α_1 -酸糖たん白質及び例えばトリグリセリド、リポたん白質、及び例えばトリグリセリド、リポたん白質及び絨毛ゴナドトロピンの如き種々のその他の生物学的成分の如き、低濃度の広汎な種類の特殊たん白質の正確な定量を行なうことができる。

本発明による試薬の使用から得られる最も重要な利点は(a)温置時間が著しく短縮され、且つ(b)大なる濃度の不溶化錯体粒子が結果として生じる改善された試験領域及び感度と共に短時間の温置時間で得られることである。これらの利点をアツセイ間の或る時点での抗原-抗体錯体の増進された不溶化により利益を受ける任意免疫学的アツセイ法に適用する。又利点をアツセイ手順間の或る時点で抗原-抗体錯体の不溶化段階に依存する免疫学的アツセイ法に適用する。

先に注目した如く、試薬の水溶液は使用中、ポリエチレングリコールと非イオン表面活性剤の混合物を約3~6重量%含有するのに加えて、又約0.7~1.7の範囲の計算されたHLB値を有すべきである。

HLB値は所定の表面活性剤の親水性-親油性バランス (従つて「HLB」) の良く確立された尺度である。表面活性剤同定のHLB系はアトラス・ケミカル社 (Atlas Chemical Industries, Inc.) により開発され、且つ化粧品及び製薬学的製品におけるアトラス表面活性剤及びソルビトールの使用に対する手引き (Guide to the Use of Atlas Surfactants and Sorbitol in Cosmetic and Pharmaceutical Products (1965)) と題するアトラス刊行物の28~36頁に詳細に記載され、前記刊行物はこれを参照してここに組み込まれている。夫々の界面活性剤はHLB数を指定されている。HLB数が低いほど該表面活性剤はより親油性であり、他方該数が高いほど該表面活性剤は親水性である。任意所定の表面活性剤のHLB値を確立する方法は良く知られており、且つ例えばアトラスHLB系「The Atlas HLB System (Code LD-97)」と題する披歴されたアトラス社刊行物に記載されている。多数の表面活性剤のHLB値は又、文献、特に問題の表面活性剤の製造により発行された文献に広く披歴され

ている。

例えば本発明の試薬に存在する如き、表面活性剤配合物のHLB値は、配合物中における夫々の表面活性剤の濃度の関数であり、従つて個々の表面活性剤の濃度を該配合物のHLB値を計算するのに考慮しなければならない。配合物のHLB値は、公認された方法に従つて、該配合物中に存在する夫々の表面活性剤の指定されたHLB値を問題の組成物中におけるその濃度で乗ずることにより計算される。例えば本発明の試薬が1重量%のポリエチレングリコール (HLB-20) 及び30.5%のHLBを有する3重量%の非イオン表面活性剤を含有する場合、試薬のHLB値は下記の如く計算される：

$$0.01 \times 20 = 0.2$$

$$0.03 \times 30.5 = 0.915$$

計 1.115...試薬のHLB値

所定の試薬が本発明試薬の0.7~1.7の範囲に入るHLB値を有するかどうかを決めるためには、配合物中の夫々の成分の量に基づいて、問題の成分の発表されたHLB値を使用するかアトラス法により決定されたHLB値を使用して、前述した如き計算を容易に行なうことができる。

本発明は(1)非イオン表面活性剤とポリエチレングリコールの混合物が該試薬がアッセイに使用される時に3~6重量%の範囲内となり、且つ(2)試薬の計算HLB値が同時に0.7~1.7の範囲内となる場合、広汎な種類の非イオン表面活性剤のポリエチレングリコールと関連した使用を意図するものである。使用時に、ポリエチレングリコール-非イオン表面活性剤混合物が試薬の3%より小の濃度、又は試薬が約0.7より小のHLB値を有する場合、免疫学的アッセイを成功させるに必要な望ましい量の抗原-抗体錯体を不溶化することが難しくなる。又、混合物が試薬の6%より大の濃度、又は試薬が1.7より大のHLB値を有する場合、望ましい抗原-抗体錯体以外の他の蛋白質が不溶化され、これによつてアッセイの選択性を損ない、その結果を無意味なものとする。

勿論、種々の理由で、試薬溶液をそれが必須の3~6%のポリエチレングリコールと非イオン表面活性剤の混合物を含有せず、又は必須の0.7~1.7のHLB値を有しないようにならうに調整し且つ

市販することができる。貧弱な貯蔵性が一つのかかる理由であることができる。しかし乍ら、先に注目した如く、かかる溶液は、免疫学的アッセイ技術におけるそれらの使用中のある時点で、又はそれ以前に、3~6%の範囲且つ約0.7~1.7のHLB値に調整を要する。この理由で、必須の3~6%の前記混合物又は約0.7~1.7のHLB値を含有しないが、免疫学的試験手順間に又はそれ以前にこれらの値に容易に調整することができる試薬は、それら試薬がアッセイ手順それ自体間に要求される濃度及びHLB範囲の特定パラメータ以外に最初あつても、本発明の範囲内である。

例えば、市販の試薬溶液は、濃度及びHLB値の特定パラメータが約3~6%及び0.7~1.7の計算されたHLB値まで溶液をもたらし目的で、免疫学的アッセイ法の遂行前に夫々希釈、濃縮、又はその他の調整段階を必要とする。かかる環境でも、市販された溶液は、なお本発明の範囲内となる。このようにして、試薬を例えば8%の如き、6%より高い混合物濃度で市販することができ、それは免疫学的アッセイ手順間の或る適当な時点かそれ以前に3~6%の範囲に希釈される。同様に0.7~1.7の範囲以外の計算HLB値を有すが、試薬溶液を0.7~1.7の計算HLB範囲にもたらしため免疫学的アッセイ手順間の或る適当な時点で、又はそれ以前に試薬溶液がどうかにかして変化せられる必要条件を有する試薬を市販することができる。

若干の場合において試薬は試験に使用される抗血清と一緒に適当なレベルまで希釈され、一方他の場合にはそれを試料で又或る場合には試料及び抗血清の両方で希釈することができる。重要な点は免疫学的アッセイ手順間の或る時点で、普通抗原-抗体反応と同時かそれ以前に、3~6%の組み合わせたポリエチレングリコールと非イオン表面活性剤の必須レベル、及び0.7~1.7の必須HLB値を、アッセイ手順中適当に作用させるため本発明試薬に与えねばならぬということである。これらの必須のパラメータを与えねばならないアッセイ手順中の時点は含まれる特定手順により変化させることができる。例えば比濁分析に対して、6%を越えるポリエチレングリコールと非イオン表面活性剤の濃度及び0.7~1.7の範囲以外のHLB値で本発明の試薬を調整し且つ市販することが便利

である。次いで、比濁分析で使用する直前に、試薬を3~6%、好ましくは約4%のポリエチレングリコール及び非イオン表面活性剤の濃度、及び0.7~1.7の範囲の計算HLB値を与えるため分析で使用する抗血清で希釈する。

混合物中におけるポリエチレングリコール及び非イオン表面活性剤の相対的割合は使用される表面活性剤に大きく依存し、広汎な限界内で変化させることができる。例示すれば、混合物は約10~90重量%のポリエチレングリコール及び10~90重量%の非イオン表面活性剤を含有する。好ましくは、混合物は約15~85%のポリエチレングリコール及び15~85%の非イオン表面活性剤を含有する。

混合物のポリエチレングリコール成分として1種又はそれ以上の異なつた形態又は種類のポリエチレングリコールを使用することができる。一般に、使用されるポリエチレングリコール重合体は、約200~10000、好ましくは約4000~6000の分子量を有する。これらの材料は、例えばユニオ

*ン・カーバイト (Union Carbide) 社からカーボワックス (CARBOWAX) 4000又は6000として、ダウ・ケミカル社 (Dow Chemical Company) からPEG4000又は6000として入手することができる。約4000の分子量の範囲が特に好ましい。

混合物の非イオン表面活性剤成分は、3~6%の混合物濃度で0.7~1.7、且つ好ましくは約0.7~1.3の計算HLB値を試薬溶液中で生ずる任意の非イオン表面活性剤であることができる。解説すれば、非イオン表面活性剤それ自体のHLB値は約10~30以上の範囲であることができる。

好適な非イオン表面活性剤は酸化エチレンとポリオキシプロピレンのブロック共重合体である。この格別な重合体及びその調整については米国特許第2674619号に記載されている。これらのブロック共重合体は酸化エチレンをポリオキシプロピレン重合体と縮合させることにより一般に調製され且つ下記の構造式で表わすことができる。



本発明の目的に対して、これらのブロック共重合体は、同様に米国特許第3450502号、第3577522号及び第3590125号に記載される如く、分子中に少なくとも50%の酸化エチレン及び少なくとも950のポリオキシプロピレン疎水基分子量を含有するのが望ましい。

かかる適当なブロック共重合体を例示すると、ワイアンドット・ケミカル社 (Wyandotte Chemical Corporation) から市販されているF-38及びF-68プルロニック®ポリオールがある。F-38は分子中に80%のポリオキシエチレン親水ユニットを含有し、且つポリオキシプロピレン疎水基は950の分子量を有する。F-38は好適な非イオン表面活性剤である。又F-68は分子中に80%のポリエチレン親水ユニットを含有するが疎水基は1750の分子量を有する。これら2種のプルロニック®ポリオールの全分子量は夫々4750及び8750である。又プルロニック®L-125は有用なことが見出されている。これらポリオールのそれ以上の記載はワイアンドット・ケミカル社の報文「The Pluronic Grid、第6版」に見出され、

該物質はそれを参考にして明細書に組み込まれている。

プルロニック非イオン表面活性剤の場合、約20~40重量%のポリエチレングリコール及び約80~60重量%の酸化エチレンとポリオキシプロピレン重合体をブロック共重合体より成る混合物が一般に好ましい。

極めて好適な試薬溶液は約4000の分子量を有するポリエチレングリコールの約1重量部及びプルロニックF-38材料の約3重量部を含有する。この溶液は3~6%の望ましいレベルの上か下かの食塩水溶媒 (例えば0.9%NaCl) 中で調整することができる。次いで、必要に応じて3~6%の望ましいレベルに調製される。溶液を食塩水中重合体混合物の8%溶液として調製し、次いでそれを免疫学的アッセイ手順で使用する以前に抗血清 (実施例1及び5参照) 又は他の適当な希釈剤で希釈する。このようにして希釈した試薬は約1%のポリエチレングリコール及び3%のF-38を含有する。その1.115のHLB値を下記の如くして計算することができる：

12

本発明の試薬系は、或る時又はその他の時に、理由はなんであれ、抗原-抗体反応によりアッセイ手順間に生成される抗原-抗体錯体を不溶化する段階を必要とする多数の従来の免疫学的アッセイ法における改善として広汎な実用を見出す。かかるアッセイ法は当業者に熟知されており、ここで詳細に記載することを要しない。これら種々のアッセイ法における本発明の適応性及び有効性、及び本発明試薬をかける手順で如何に使用するかの詳細はこの明細書の記載より当業者に明らかとなり且つこのようにしてこれら特性をここで過剰に繰り返して提供しない。例えば、本発明試薬を、螢光又は比色検出用の透明上澄液を生ぜしめるため抗原-抗体錯体の沈殿に依存する任意系を増進させるのに使用することができる。試薬を又、比濁、酵素又はその他のアッセイ系用の生物学的流体又は試薬（例えば、脂質、塩、及び無関係のたんぱく質）に見出される妨害物質を除去するために使用することができる。これは、これらの反応体を洗浄し且つ再懸濁させる目的で反応溶液から

の反応体の除去により達せられる。
特に、本発明試薬は不溶性抗原-抗体錯体の相対的濃度を増加し且つ所定のアッセイ系の試験範囲及び感度を増加させるために利用することができる。これらの原理を比濁法による免疫錯体からの定量的光散乱に適用することができ、現在これは本発明の好適例である。本発明試薬を使用する比濁分析は種々の免疫グロブリンの分析で特に有用である。しかし乍ら、例えば放射線免疫拡散(RID)、酵素分析、及び例えば免疫電気泳動(IEP)、逆電気泳動(CEP)、及び電気免疫拡散(EID)の種々の型式の電気泳動技術の如き、沈殿抗体に基づくその他の試験系でこれらの試薬を利用することができる。

本発明の試薬を、例えば放射線免疫アッセイ(RIA)に普通使用される抗原-抗体共沈の主要相互反応に依存する免疫学的アッセイを増進させるのに使用することができる。本発明のこの増進させた不溶化特性を、当業者により良く理解されている方法におけるRIA、比濁、及び螢光アッセイの担体として使用される不活性粒子に抗体又は抗原を付着させる種々の方法学に又利用することができる。

種々の放射線免疫アッセイ技術は体液中に見出

される比較的小さい濃度の生物学的成分を定量するために採用されている。ラベルト免疫抗原-抗体錯体を製造するために、同位体ラベルド抗原又は抗体を対応する抗原又は抗血清と反応させる。次いで普通には、これらの錯体を不溶性担体、沈殿試薬又はその他の既に知られた技術により不溶性にしなければならない。遊離又は不反応のラベルド抗原又は抗体は洗浄技術により除去することができる。次いで沈殿錯体の放射性濃度をガンマ法又は液体シンチレーション計数により定量する。この型式の分析に対して使用される計器の例はオート・ガンマ・カウンター (Auto Gamma Counter、Nuclear Chicago、Inc.) である。本発明の試薬は必須、錯体の不溶化段階を増進させるのに有用であり、このようにして分析を改善する。実施例7で放射線免疫アッセイ手順における本発明試薬の使用を詳述する。

酵素技術は又、体液中に見出される小濃度の生物学的成分を定量するために採用される。酵素ラベルド抗原又は抗体を免疫ラベルド抗原-抗体錯体を生ぜしめるため特殊な抗体又は抗原と反応させる。これらの錯体は不溶性担体、沈殿試薬又はその他の技術により不溶性にされる。遊離又は不反応の酵素ラベルド抗体又は抗原は洗浄技術により除去される。結合又は反応した酵素は分光光度計又は螢光光度計で測定することができる着色又は螢光性上澄液を生ぜしめるため適当な基体と反応を生ずることができる。この目的で有用な計器の例はベックマンDBスペクトロホトメーター (Beckman DB Spectrophotometer、Beckman Instrument Company) 及びアミンコーバウマンスペクトロホトフルオロメーター (Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer、American Instrument Company) である。本発明の試薬は又必須の錯体不溶化段階を増進させるために有用であり、かくして分析を改善する。

比濁分析における試薬の有用さは前述の如く詳細に検討されており、且つ実施例5で更に例示されている。

今や当業者に取り、本発明の改善された免疫学的試薬が免疫学的アッセイ手順の分野で広汎な有用性を有することが明らかである。改善された試薬を使用し、臨床技術士は、例えば免疫グロブリンIgG、IgA、IgM、トランスフェリン、補体

15

C₃、バプトグロビン、 α_1 -抗トリプシン、 β -リポたんぱく質、アルブミン、 α_2 -マクログロブリン、 α_1 -酸糖たんぱく質、及び例えばトリヨードチオニン (T₃)、チロキシン (T₄)、トリグリセリド、絨毛ゴナドトロピンリポたんぱく質の如きその他の種々の生物学的成分、及びその定量が本発明により生ずる増進された不溶化効果から得をするその他の多くの成分の如き、広範囲の濃度の多くの特殊たんぱく質の正確な定量を行なうことができる。

本発明で有用性を見出したいの適用において、望まれる生物学的試験成分又は成分は本発明の水性試薬溶液に添加され、例えば室温 (20~25℃) で約1時間の如く、所定時間温置され、次いで例えば比濁分析の場合比濁計の如き、適当な計装化上で読む。試料の結果を未知の濃度を定量するため対照試料と比較する。

次に本発明の実施例につき説明する。

実施例 1

4000の分子量を有するポリエチレングリコール 20 25重量部をプルロニック F-38 75重量部に添加して試薬溶液を調製し、次いで混合物を普通の塩水 (0.9% NaCl) に前記混合物の 8 重量%まで溶解した。この溶液は、例えば抗血清で実施例 5 の段階 3 における如く 4 % の混合物濃度 (HLB 比 25 7 -1.115) に希釈し、免疫学的アッセイ手順に直接使用するか、それを使用直前まで 8 % の形態で保持することができた。

実施例 2

分子量 6000 のポリエチレングリコールを分子量 30 4000 の材料の当量と置換したことを除いて、実施例 1 に繰り返した。

実施例 3

プルロニック F-68 で当量の F-38 を置換したことを除き実施例 1 を繰り返した。

実施例 4

広汎な種類の試薬溶液を調整するため一連の実験において異なる量で F-38 を、テトロニック 707、908、1107、1307、1508；プルラフアック 17R8、25R8、D25、A38 および A39；プルロニツ 40 ク L125、アーラセル 165；および G-3000 で置換したことを除き、実施例 1 を繰り返した。

実施例 5

実施例 1~4 で調製した免疫学的試薬を免疫グ

16

ロブリン (IgA、IgG、IgM)、補体 C₃ および トランスフェリンの別々の比濁アッセイに使用し、各アッセイを以下の如く行なつた：

1 それぞれの前記生物学成分用対照標準 (既に知られたアッセイの) を塩水中 1 : 100 に希釈した。

2 未知のものを次いで同様に塩水中 1 : 100 に希釈した。

3 IgG、IgM、IgA、C₃ および トランスフェリンに対する予め希釈した抗血清を実施例 1、2、3 または 4 からの 8 % の免疫学的試薬でそれぞれ 1 : 2 に希釈し (場合により) かつ溶液中ポリエチレングリコールと非イオン表面活性剤の 4 % 濃度およびすべての場合に 0.7~1.7 間の計算 HLB を生ぜしめるために転倒により混合した。

4 0.45 μ ミリポアフィルタ (Millipore filter) を通じて濾過した。

5 適当に標識付けたブランク、対照標準 # 1、# 2、# 3、# 4、# 5、# 6 および未知のものの一連の試験管 (10mm \times 75mm 処分可能な培養管) を調整した。

6 各試験管に、段階 3 で調製した抗血清と試薬の希釈混合物 1 ml を添加した。

7 IgG、IgA および トランスフェリン用の適当な管に 25 μ l の対照および未知の希釈剤を添加した (IgM および C₃ に対して 100 μ l)。

8 適当なブランク管に相当して 25 または 100 μ l の塩水を収容した。

9 試験管を転倒により混合し次いで室温 (20~25℃) で 1 時間温置した。

10 試料ブランクを、(場合により) 8 % の溶液を抗血清の代りに塩水で希釈したことを除いて段階 3 における如くして調整した、実施例 1~4 からの濾過試薬 1 ml を使用することにより調整した。ブランクを前の段階 (5 および 6) における如く同一の標識付けした管に入れた。

11 同一の対照および試料容積を前 (段階 7) の如くそれぞれの管に添加した。

12 すべての管をレーザー・ネフエロメーター・PDQ™ (Laser Nephelometer PDQ™、Hyland Laboratories) で光散乱相対%を読んだ。

13 ブランクを読み次いで計器により反応値から

電子的に減じた。

14 対照結果を光散乱相対%対照濃度として線形グラフ紙上に画いた。

15 未知の値を対照曲線から読むことにより決定した。

当実施例で使用した本発明の免疫学的試薬は、ポリエチレングリコールのみを含有する試薬より実質的に大なる抗原-抗体錯体、広範囲にわたるいつそうの直線性および大なる感度を示した。

実施例 6

この実施例では、前記実施例5において得られた試薬が広範囲にわたる直線性および大なる感度を示すことを、さらに支持するための実験を行う。

ポリエチレングリコール単独、非イオン表面活性剤単独、およびポリエチレングリコールと非イオン表面活性剤の組合せで、塩水溶液に溶解した溶液を調製した。次いで各溶液について次に示す試験をした。

(a) 試験する抗原に対し最適濃度の特定抗体を含有する抗血清につき1対1の容量に溶液を希釈した。その結果、本発明のポリエチレングリコールと非イオン表面活性剤の混合物の場合、約3~6重量%の混合物を含有し0.7~1.7のHLB値を有する溶液となり、ポリエチレングリコール単独または非イオン表面活性剤単独の場合に*

* は、合計した場合に本発明のポリエチレングリコールと非イオン表面活性剤の混合物中の重合体の全量に等しい十分な重合体を含有する溶液となる。

5 (b) 既知レベルの所定の抗原を含有する溶液25 μ lを先の溶液(a)1 mlと混合した。これを既知の抗原レベルを変化させた数種の抗原溶液に対してくり返した。抗原を加えない以外は同じ方法でブランクを調整した。

10 (c) 次に、得られた溶液(b)とブランクを、前述のレーザー・ネフエロメーターPDQ™に置き、十分間室温で温置した。

(d) ブランクと溶液の光散乱%を測定し記録した。読取った値はブランクに対して自動的に補正した。各試料に対して1回以上光散乱%を読取った場合は平均した。

その結果、種々の非イオン表面活性剤の数値が求められた。実験結果を第1~5表および第1~5図に示す。各データはネフエロメーターによって観察された光散乱の範囲によって測定した抗原-抗体錯体の不溶化範囲を示す。

第1表には、本発明のポリエチレングリコールを1重量%およびプルロニックF-38を3重量%含有し、全重合体含量が4重量%である溶液について示した。

第 1 表				
平均 光 散 乱 %				
(1)	(2)	(3)	(4)	
IgGレベル (mg/dl)	1%PEG	3%プルロニック F-38	計算値 1%PEG+3% プルロニック F-38((1)+(2))	実測値 1%PEG+3% プルロニック F-38
.3	- 1.5	- 1.5	- 3.0	0
4.68	+ 3.9	- .3	+ 3.6	1.5
9.37	+ 1.1	- 1.5	- .4	.2
18.75	- .3	- 1.3	- 1.6	6.3
37.5	- .2	+ 1.3	+ 1.1	21.4
75	+ .9	+ 3.3	+ 4.2	71.1

まず、広範囲のIgG濃度について1重量%のポリエチレングリコール(PEG)単独により生成した抗原-抗体錯体の不溶化範囲を測定した(1)。次いで、同じ範囲のIgG濃度について3重量%の

プルロニックF-38単独によって生成した抗原-抗体錯体の不溶化範囲を測定した(2)。次いで、これら2種の重合体、1重量%のポリエチレングリコールおよび3重量%のプルロニックF-38を合

*%のプルロニックF-38重合体混合物が存在すると、アッセイの免疫検出範囲は大幅に改良される。特に、ポリエチレングリコール単独(1)およびプルロニックF-38単独(2)の場合IgG37.5mg/dlでも検出値が小さいが、本発明の混合物(4)ではIgG10mg/dlで検出できるので、IgGの量が少なくすむ。またネフエロメーターの平均光散乱%を大きい値で読取ることができるので、アッセイの感度と再生を改善できる利点がある。

次に、本発明の1重量%のポリエチレングリコールおよび3重量%のプルロニックF-38の混合物によつて生成した抗原-抗体錯体の不溶化範囲を実際に測定した(4)。そこで、計算値(3)と実測値(4)を比較すると、実測値(4)の方が直線的に大きく増加している。

当業者が認めるように分析する抗原または免疫種の光散乱%と濃度の関係が直線的であることは 10 意義がある。直線の範囲が大きい程、アツセイの検出範囲は広くなる。従つて免疫反応の間に本発明の 1 重量%のポリエチレングリコールと 3 重量*

同様に、ポリエチレングリコールと他の重合体との組合せを変えて、第2～5表および第2～5図に示した。

	(1)	(2)	(3)	(4)
			計算値	実測値
1 g G レベル (mg/dL)	1 % PEG	3 % テトロニツク	1 % PEG + 3 % テトロニツク 707 ((1)+(2))	1 % PEG + 3 % テトロニツク 707
4.68	1.5	.6	2.1	1
37.5	9.25	11.5	20.75	12
75	20.5	24	44.5	20
150	36	38.5	74.5	37
300	46	65.5	111.5	62
600	49	120.5	169.5	112
1200	3.9	131	134.9	193

	(1)	(2)	(3)	(4)
			計算値	実測値
I g G レベル		3 % テトロニツク	1 % PEG + 3 % テトロニツク	1 % PEG + 3 % テトロニツク
(mg/dl)	1 % PEG	1 1 0 7	1 1 0 7 ((1)+(2))	1 1 0 7
4.6 8	1.5	.8	2.3	1
3 7.5	9.2 5	1 1	2 0.2 5	1 3
7 5	2 0.5	2 3	4 3.5	2 1
1 5 0	3 6	4 3	7 9	4 0
3 0 0	4 6	6 2.5	1 0 8.5	5 8
6 0 0	4 9	1 1 7.5	1 6 6.5	1 1 1
1 2 0 0	3.9	1 3 6.5	1 4 0.4	1 9 8

第 4 表
平 均 光 散 乱 %

IgGレベル (mg/dl)	(1)	(2)	(3) 計算値 3%PEG+1% テトロニック 1307((1)+(2))	(4) 実測値 3%PEG+1% テトロニック 1307
	3%PEG	1%テトロニック 1307		
4.68	.2	— .1	.1	.7
37.5	11	1	126	10.5
75	24	7.8	31.8	19.5
150	43	16.9	59.9	40.5
300	71.5	20.7	92.2	67
600	110	9	119.6	131
1200	50	1.8	51.8	172.5

第 5 表
平 均 光 散 乱 %

IgGレベル (mg/dl)	(1)	(2)	(3) 計算値 3%PEG+1% テトロニック 1508((1)+(2))	(4) 実測値 3%PEG+1% テトロニック 1508
	3%PEG	1%テトロニック 1508		
4.68	.2	0	.2	.8
37.5	11	5.6	16.6	12
75	24	14.6	38.6	23.5
150	43	33	76	38
300	71.5	43.2	114.7	63
600	110	46.6	156.6	118
1200	50	3.4	53.4	200

第2～5表においても、第1表と同様に計算値(3)よりも測定値(4)の方が直線的な結果が得られた。特にIgGが600～1200mg/dlのアッセイ範囲で顕著である。

実施例 7

この実施例では人の甲状腺刺激ホルモン(HTSH)の定量のための放射線免疫アッセイ手順における本発明の免疫学的試薬の使用を記載する。

本発明の免疫学的試薬の試料を0.9%の塩分水溶液中ポリエチレングリコールの5%溶液8.4mlを6%プルロニックF-38非イオン表面活性剤20mlと混合することにより調製した。

放射線免疫アッセイを下記の如くして遂行し

た：人の絨毛ゴナドトロピン(HCG)に吸収させた0.050mlのウサギ抗-HTSHを種々の強度の0.200mlのHTSH標準と混合した。0.050mlの磷酸塩緩衝剤、pH7.4を次いで混合物に添加し、次いで該混合物を37℃で2時間温置した。この時点で、 P^{25} で標識付けされた0.100mlのHTSHを添加し次いで混合物を37℃で3時間さらに温置した。次いで先に調製した本発明の1.0mlの試薬を添加しかつ混合物を室温で1時間温置した。混合物への添加に際し試薬の希釈により、ポリエチレングリコールおよびF-38の濃度は1.4および4.2重量%からそれぞれ1および3%に減じた。混合物を1000×9で10分間遠心分離した。遠心分離した固体の洗浄を要する場合には、洗浄液溶液は試薬が

23

アッセイで最初に使用された時の本発明試薬と同一濃度、すなわち1%のポリエチレングリコールおよび3%のF-38と同一の濃度を含有しなければならない。上澄液をデカントし次いで沈殿物をカウントした。この手順を種々の異なつたHTSH標準に対して繰り返しかつ標準曲線を種々の沈殿物中でのカウント対相当するHTSH標準の濃度を画くことにより得られる。

標準曲線が一度得られると、アッセイはHTSH標準が試験試料により置き換えられることを除いて、前述した手順を使用し、未知の試料について

24

* 遂行される。試料中のHTSHレベルを標準曲線上の沈殿物カウントの所在から容易に定量する。

本発明試薬溶液の使用はポリエチレングリコールのみを使用する試薬から得られるものを越え生成された沈殿物の範囲を増進し、かつ改善された放射線免疫アッセイをもたらす。

比較例

4重量%のプルロニックF-38単独、および4重量%のポリエチレングリコール単独の場合の抗原-抗体錯体不溶化に対する効果を比較した。この結果を第6、7表および第6、7図に示す。

第 6 表

平均光散乱% (実測値)

IgA レベル (mg/dl)	4% PEG	4% プルロニック F-38
9.37	1.4	2.6
18.75	2.8	5
37.5	6.7	12
75	17.4	16.5
150	40	49
300	87	87.5
600	128	128
1200	137	170

第 7 表

平均光散乱% (実測値)

IgG レベル (mg/dl)	4% PEG	4% プルロニック F-38
9.37	3.5	3.7
18.75	7.2	7.0
37.5	17	14.5
75	26.5	26
150	45.5	43
300	87.5	82.5
600	147	141
1200	134	186

このデーターから、4重量%のプルロニックF-38単独の方が、4重量%のポリエチレングリコール単独の場合よりも不溶化が優れているといえる。第6、7表ともに600~1200mg/dlでプルロニックF-38の方がデーターの直線化が改善されている。

従つて、例えば約4重量%の酸化エチレンとポリオキシプロピレン重合体のブロック共重合体を含有する水溶液を用いても、ポリエチレングリコールの存在なしで適当な比濁アッセイ結果を達成することができる。この結果は、一般にポリエチレングリコールが最上のものであると考えられて

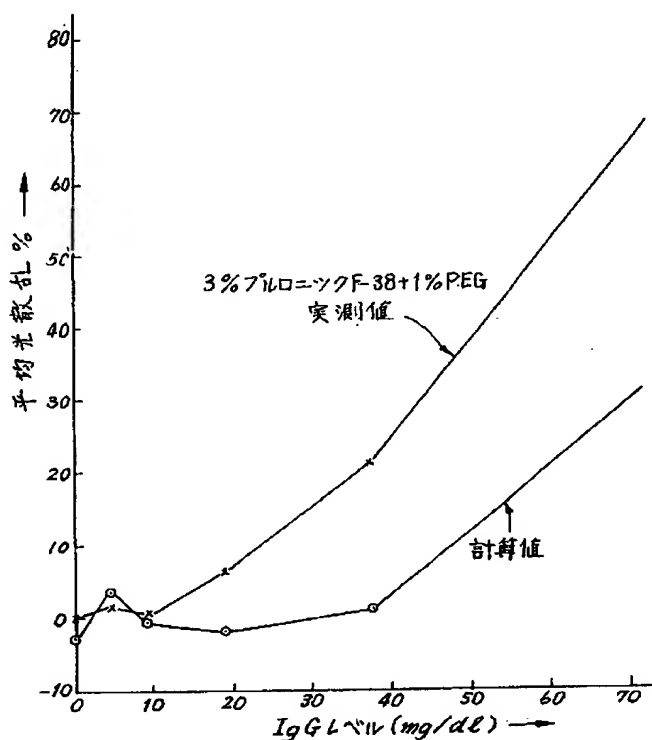
いるのに対して予期しない結果と言える。

しかしながら、前述したように本発明のブロック共重合体とポリエチレングリコールの混合物の方が、一層直線的なグラフが得られるので、最適の結果を得るために好ましい。

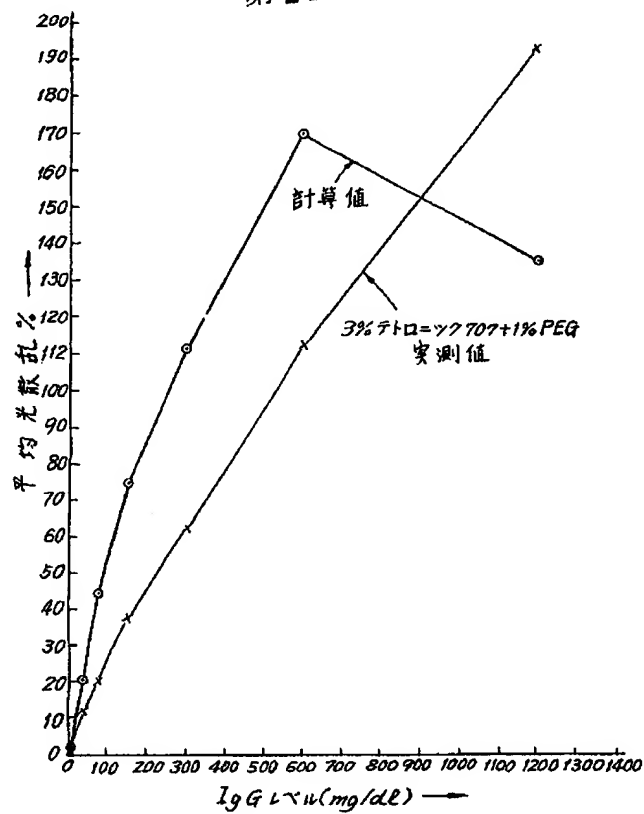
図面の簡単な説明

第1～5図は本発明実施例による各IgGレベル (mg/dl) における光散乱%の実測値と計算値を示すグラフである。第6, 7図は4重量%プルロニックF-38単独および4重量%ポリエチレングリコール単独の場合の各IgGレベル (mg/dl) における平均光散乱%の実測値を示すグラフである。

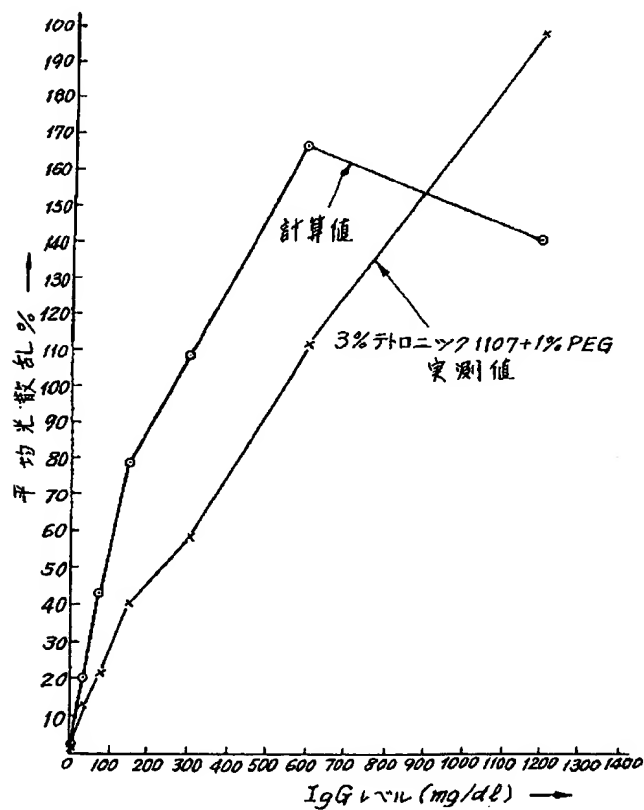
第1図



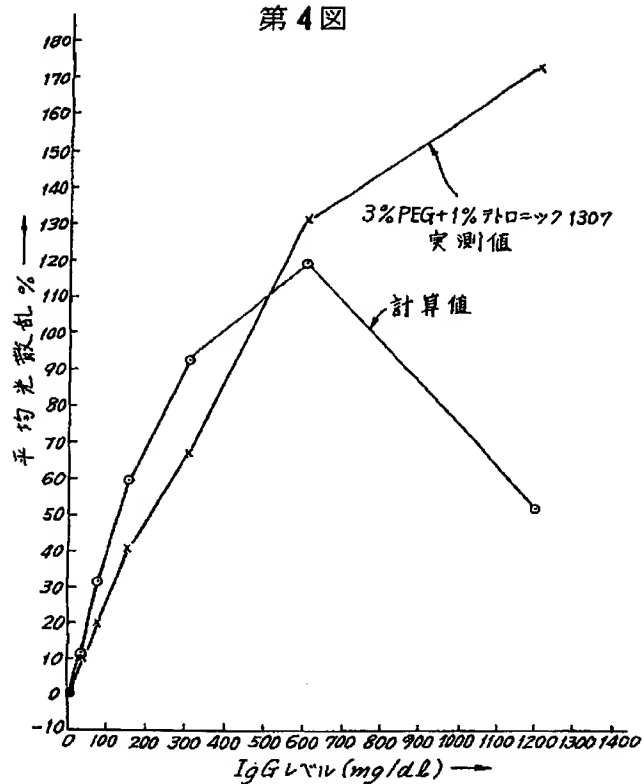
第2図



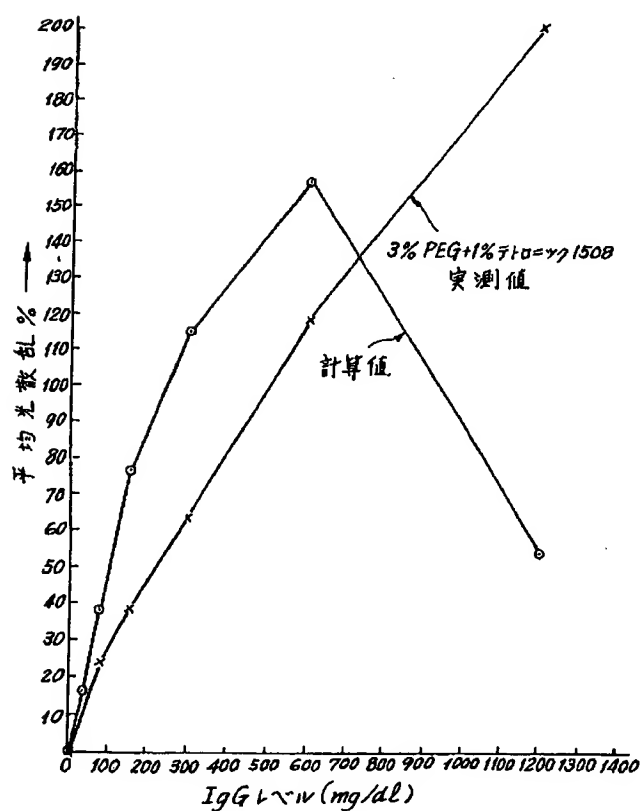
第3図



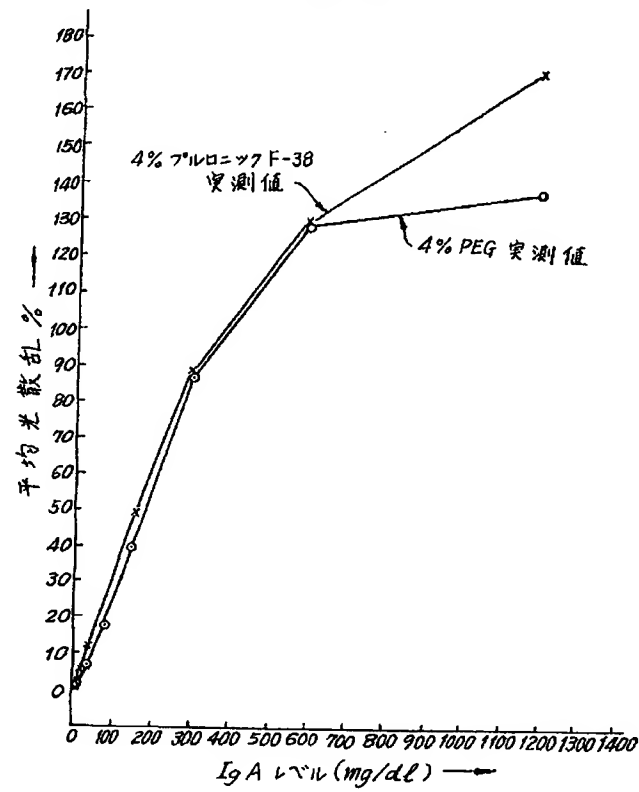
第4図



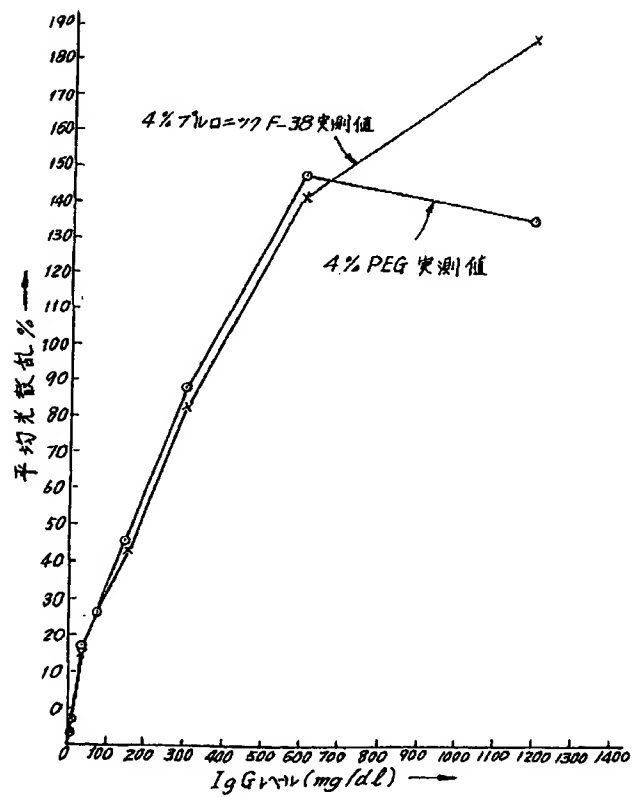
第5図



第6図



第7図



昭和51年特許願第7067号(特公昭60-4938号、昭60. 2. 7発行の特許公報6(1)-6〔384〕号掲載)については特許法第64条及び特許法第17条の3の規定による補正があつたので下記のとおり掲載する。

Int. Cl. ⁵	特許第1566582号
G 01 N 33/536	識別記号 庁内整理番号
A 61 K 39/00	7906-2G
	8829-4C

記

- 1 「特許請求の範囲」の項を「1 少なくともポリエチレングリコール溶液より成る免疫学的試薬において、該試薬が前記ポリエチレングリコール10～90重量%とこれ以外の非イオン表面活性剤90～10重量%との混合物の水溶液より成り、前記水溶液が使用中、約3～6重量%の該混合物を含有し且つかかる範囲内で約0.7～1.7の範囲の計算HLB値(親水性-親油性バランス値)を有して成ることを特徴とする免疫学的試薬。
- 2 前記混合物濃度が最初前記3～6%の濃度の範囲でなくとも、前記濃度を前記範囲内に調整するため、該水溶液に抗血清を含有させて成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の免疫学的試薬。
- 3 前記非イオン表面活性剤が(a)酸化エチレンとポリオキシプロピレンのブロック共重合体、(b)直鎖第一級脂肪族オキシアルキル化アルコール、(c)グリセリンモノステアレート、(d)アルキルアリアルスルホネート又は(e)オキシプロピレン基とオキシエチレン基と6個以下の炭素原子を有する窒素含有反応性水素化合物の核から成る縮合生成物より成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の免疫学的試薬。
- 4 ポリエチレングリコールが約4000～6000の分子量を有し、且つ非イオン表面活性剤が酸化エチレンとポリオキシプロピレンのブロック共重合体より成り、溶液のHLB値が約0.7～1.3より成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の免疫学的試薬。
- 5 水溶液が約20～40重量%のポリエチレングリコールと約80～60重量%の酸化エチレンとポリオキシプロピレン重合体のブロック共重合体を含有して成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の免疫学的試薬。
- 6 前記混合物の濃度が約4重量%であり且つ前記混合物が約25重量%のポリエチレングリコールと約75重量%の前記ブロック共重合体を含有して成ることを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の免疫学的試薬。
- 7 抗体-抗原錯体を生成させるための抗体と抗原との反応を含む免疫学的アッセイ法において、前記反応により生成された抗原-抗体錯体の不溶化を実質的に増加させるため、ポリオチレングリコール10～90重量%とこれ以外の非イオン表面活性剤90～10重量%との混合物の水溶液より成り、前記水溶液が使用中約3～6重量%の該混合物を含有し且つかかる範囲内で約0.7～1.7の範囲の計算HLB値(親水性-親油性バランス値)を有する少なくともポリエチレングリコール溶液より成る免疫学的試薬を使用することを特徴とする免疫学的アッセイ法。
- 8 前記試薬を比濁、酵素、電気泳動又は放射線免疫アッセイを遂行するために利用することを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の免疫学的アッセイ法。
- 9 前記抗原、抗体及び試薬を、前記抗体-抗原錯体の微小濃度の関数である光散乱測定を行うことにより比濁分析を行なう前に前記抗体-抗原錯体を生成するために温置することを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の免疫学的アッセイ法。
- 10 前記試薬、及び免疫グロブリンの形態の前記抗体及び抗原を、不溶化免疫グロブリンの微小濃度の関数である光散乱測定を行なうことにより比濁分析を実施する以前に不溶化免疫グロブリンの抗体-抗原錯体を生ぜしめるため温置することを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の免疫学的アッセイ

法。」と補正する。

2 第4欄第36行～第37行「ポリエチレングリコール…表面活性剤の」を「ポリエチレングリコール10～90重量%とこれ以外の非イオン表面活性剤90～10重量%の」と補正する。

3 第9欄第7行～第11行「使用される…含有する。」を「ポリエチレングリコール10～90重量%及び非イオン表面活性剤90～10重量%である。」と補正する。